异位表达 *Dichaete* 对果蝇足部发育的影响及其作用机制

董 玮[1], 孔 悦[1,2], 马恩波[1], 张建珍[1], 张 敏[1], 张徐波[1,*]

(1. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006; 2. 山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要:【目的】果蝇 *Dichaete* 基因是 Sox 家族 B 亚家族基因,其表达贯穿整个胚胎发育阶段,在个体发育过程中发挥重要作用。*Dichaete* 在野生型果蝇幼虫足芽上也有微弱表达,然而其在足发育过程中的作用少有报道。本研究旨在研究异位表达 *Dichaete* 对果蝇足部形态构成的影响,探索相关的作用机制。【方法】黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster en-Gal*4 品系雄性成虫与 *UAS-Dichaete* 转基因品系处女蝇杂交,驱动 *Dichaete* 异位表达,解剖子一代成虫足,在显微镜下观察异位表达的 *Dichaete* 对成虫足形态结构的影响;同时采用免疫组化技术检测异位表达 *Dichaete* 对果蝇足芽细胞凋亡和 *Distal-less*(*Dll*)表达的影响。【结果】异位表达 *Dichaete* 导致黑腹果蝇成虫足末端结构缺陷,引起 3 龄幼虫足芽细胞凋亡增加,上调了 *Distal-less* 基因的表达,但对 Wg 和 Dpp 信号均无影响;抑制细胞凋亡也无法拯救该缺陷。【结论】异位表达 *Dichaete* 导致黑腹果蝇成虫足末端结构缺陷,*Dichaete* 可能通过上调 *Distal-less* 基因影响足部发育。

关键词: 黑腹果蝇; *Dichaete*; 异位表达; 足; 细胞凋亡; *Distal-less*

中图分类号: Q963 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)02-0149-07

Effects of ectopic expression of *Dichaete* on leg development of *Drosophila* and its underlying mechanism

DONG Wei[1], KONG Yue[1,2], MA En-Bo[1], ZHANG Jian-Zhen[1], ZHANG Min[1], ZHANG Xu-Bo[1,*] (1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract:【Aim】The *Drosophila Dichaete* gene is a gene of Sox B subfamily, which is expressed throughout embryogenesis and plays an important role in early development. *Dichaete* also exists in the leg disc of larvae, but little is known about its function in legs. The aim of this study is to investigate the effect of ectopic expression of *Dichaete* on leg development of *Drosophila* and to explore the underlying mechanism.【Methods】*en-Gal*4 and *UAS-Dichaete* of *Drosophila melanogaster* were crossed, and *Dichaete* was ectopicly expressed under the control of *en-Gal*4 in the progeny. Legs of the progeny were cut off and their structure was observed using binocular microscope. Immunohistochemistry was used to detect cell apoptosis and *Distal-less* (*Dll*) expression in leg discs.【Results】The ectopic expression of *Dichaete* resulted in distal leg defects of adults, enhanced apoptosis in the 3rd instar larvae, and increased expression of *distal-less* in *D. melanogaster*, but had no effect on Wg and Dpp signaling activities. Inhibition of apoptosis could not rescue the leg defects.【Conclusion】Ectopic expression of *Dichaete* interferes with maintenance of *distal-less* gene, leading to structural defects of adult leg of *D.*

基金项目: 国家自然科学基金项目(31402021)

作者简介: 董玮, 女, 1983 年 12 月生, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 讲师, 研究方向为果蝇生长发育机制, E-mail: 13586974@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangxubo@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-08-28; 接受日期 Accepted: 2017-11-06

melanogaster.
Key words: *Drosophila melanogaster*; *Dichaete*; ectopic expression; leg; apoptosis; *Distal-less*

Sox 蛋白是一类含有 HMG-box（high mobility group box）结构域的高保守蛋白家族，与哺乳动物中睾丸决定因子 SRY/Sry（sex determining region of Y chromosome）序列具有高度相似性（Gubbay *et al*., 1990; Baxevanis and Landsman, 1995）。由于其具有的特殊结构域，Sox 蛋白可以使与其相结合的 DNA 弯曲变形，因此，Sox 蛋白家族在染色体结构形成以及下游基因的转录调控中起着重要作用（Ferrari *et al*., 1992）。大量研究表明，Sox 蛋白参与不同生物体的多种发育过程，如线虫的组织分化、昆虫的胚胎发育以及哺乳动物的性别决定等（Wegner, 1999; Aleksic *et al*., 2013）。目前 Sox 家族中研究最为深入的成员是 *Sox*2，其属于 B 亚族，是哺乳动物特有的基因，已有研究报道 *Sox*2 是神经系统发育过程所必需的调控因子（Collignon *et al*., 1996; Pevny *et al*., 1998）。此外，*Sox*2 通过激活或抑制生物个体发育过程中的关键信号通路，参与胚胎干细胞的细胞多能性，发挥重要的调控作用（Boyer *et al*., 2005）。

果蝇 *Dichaete* 基因是哺乳动物 *Sox*2 的同源基因，与 *Sox*2 在功能上具有高度保守性（Sanchez-Soriano and Russell, 1998, 2000）。已有的研究显示，*Dichaete* 参与调控果蝇的胚胎发育过程，并与细胞的自我更新调控有关（Russell *et al*., 1996）。研究发现，*Dichaete* 在动物胚胎分节和神经胶质的发育中发挥重要作用，在缺失 *Dichaete* 的果蝇突变体中，神经胶质的分化及神经轴突的发育出现缺陷（Sanchez-Soriano and Russell, 1998）。同时，*Dichaete* 调控大脑特定神经细胞的分化以及后肠的形态发生（Sanchez-Soriano and Russell, 2000）。Overton 等（2007）报道，果蝇 Dichaete 调控腹部表皮构型调控最下游转录因子 *shavenbaby*（*svb*）基因的表达，从而调控腹部表皮毛的形态发生（Payre *et al*., 1999; Overton *et al*., 2007; Chao *et al*., 2007）。此外，果蝇的 Sox 蛋白还参与调控细胞的增殖和凋亡，其中 SoxF 通过 Wg 反馈回路控制果蝇翅芽的增殖（Dichtel-Danjoy *et al*., 2009），而 *Dichaete* 的高表达诱导翅芽细胞凋亡，导致成虫的翅铰链区形态缺陷（Russell, 2000）。

果蝇的足由足芽发育而来，在足芽的发育过程中，上皮细胞响应蜕皮激素 20E 的变化（Fristrom, 1988），在幼虫阶段分化形成单层细胞，单层细胞受多种形态发育机制调控，进一步分化产生成虫的足（Trinkaus, 1984）。足芽的发育需要前后隔间轴线（AP）、背腹隔间轴线（DV）和近远端轴线（PD）的分工与协作（Estella *et al*., 2008）。在形变的早期——幼虫阶段，足芽的变化十分剧烈，主要是沿着 PD 端伸长，沿着两侧端压缩，这种变化对成虫足结构的形成起着关键作用（Condic *et al*., 1991）。前人的研究报道，*Dichaete* 在幼虫阶段的足芽中有微弱的表达（Russell, 2000），然而相关的功能研究鲜有报道。本研究以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 为实验材料，在足芽异位表达 *Dichaete*，结合免疫组化以及形态学观察的方法，检测异位表达 *Dichaete* 对果蝇足部形态构成的影响，研究其相关作用机制，揭示发育过程中关键转录因子之间的调控关系，为进一步研究果蝇足部的发育机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

转基因黑腹果蝇 *en-Gal*4, *dpp-Gal*4, *UAS-p*35, *Dll-LacZ* 来自中国农业大学沈杰教授课题组，*UAS-Dichaete* 购自 Bloomington 果蝇中心。所有品系均用标准玉米酵母培养基饲养，饲养条件为 25 ± 1℃，光周期 16L: 8D，相对湿度 50% ~60%。本实验所用的杂交品系：（1）*en-Gal*4 与 *UAS-Dichaete* 杂交，子一代基因型为 *en* > *Dichaete*；（2）组建了 *en* > *p*35 基因型果蝇，与 *UAS-Dichaete* 杂交，子一代基因型为 *en* > *Dichaete* + *p*35；（3）组建了 *en-Gal*4；*Dll-LacZ* 基因型果蝇，与 *UAS-Dichaete* 杂交，子一代基因型为 *en* > *Dichaete*；*Dll-lacZ*。

1.2 足芽解剖及免疫组化

将 30℃ 培养 96 h 的黑腹果蝇 3 龄幼虫取出置于磷酸盐缓冲液（pH 7.2）中，用镊子将虫体分为两段，内脏翻出，去掉肠道和脂肪体，保留表皮及成虫盘组织，转移至 4% 的甲醛溶液（含 0.5% Triton）中。全部解剖过程需在冰浴中快速完成。

甲醛溶液固定 40 min 后，用磷酸盐缓冲液多次清洗固定液并加一抗抗体，4℃ 过夜，清洗一抗并加入二抗，避光置于室温下孵育 1 h。洗涤二抗并在载玻片上进行第 2 次解剖，剖出足芽组织，固定在 50% 的甘油溶液中封片保存。本实验所用的抗体如

下：一抗：Dichaete 抗体（1∶200，v/v）英国剑桥大学 Russell 教授赠与，Casepase-3 抗体（1∶200，v/v），β-Gal 抗体（1∶200，v/v），Wingless 抗体（1∶200，v/v），购于 DSHB 公司；pMad 抗体（1∶200，v/v）购自 Abcam 公司。二抗：羊抗鼠（1∶250，v/v），驴抗兔（1∶250，v/v），购于 Jackson 公司。

1.3　组织拍照与图像处理

将成虫足解剖下来，置于加有 75% 酒精的 2 mL EP 管中，在转速为 75 r/min 的摇床上清洗。清洗 3 次，每次 10 min，最后一次用 50% 的甘油清洗，待甘油与组织充分接触后，将成虫足置于干净的载玻片上，封片，拍照（倒置荧光显微镜 EVOS FL 成像系统）。Photoshop6.0 软件用于剪切拼接图片。使用 Image-J 软件对图片进行荧光强度测定，数据采用 SPSS22.0 软件 *T* 检验进行统计学分析。

2　结果

2.1　*Dichaete* 异位表达导致黑腹果蝇成虫足结构缺陷

在野生型果蝇幼虫足芽中，*Dichaete* 的表达极为微弱。本研究中，利用 *en-Gal4*，*dpp-Gal4* 驱动 *Dichaete* 在足芽异位表达，以研究其对果蝇足发育的影响，不同的 Gal4 驱动 *Dichaete* 异位表达，均出现相似的结果，本文以 *en* > *Dichaete* 为例展示。30℃ 饲养 96 h 后，Dichaete 抗体检测结果显示，对照组果蝇幼虫足芽中有微弱的 *Dichaete* 表达（图 1：A），在处理组 *en* > *Dichaete* 果蝇幼虫足芽后隔间区检测到强烈的 *Dichaete* 表达（图 1：B ~ C），荧光信号强度分析结果显示，处理组果蝇幼虫足芽的后隔

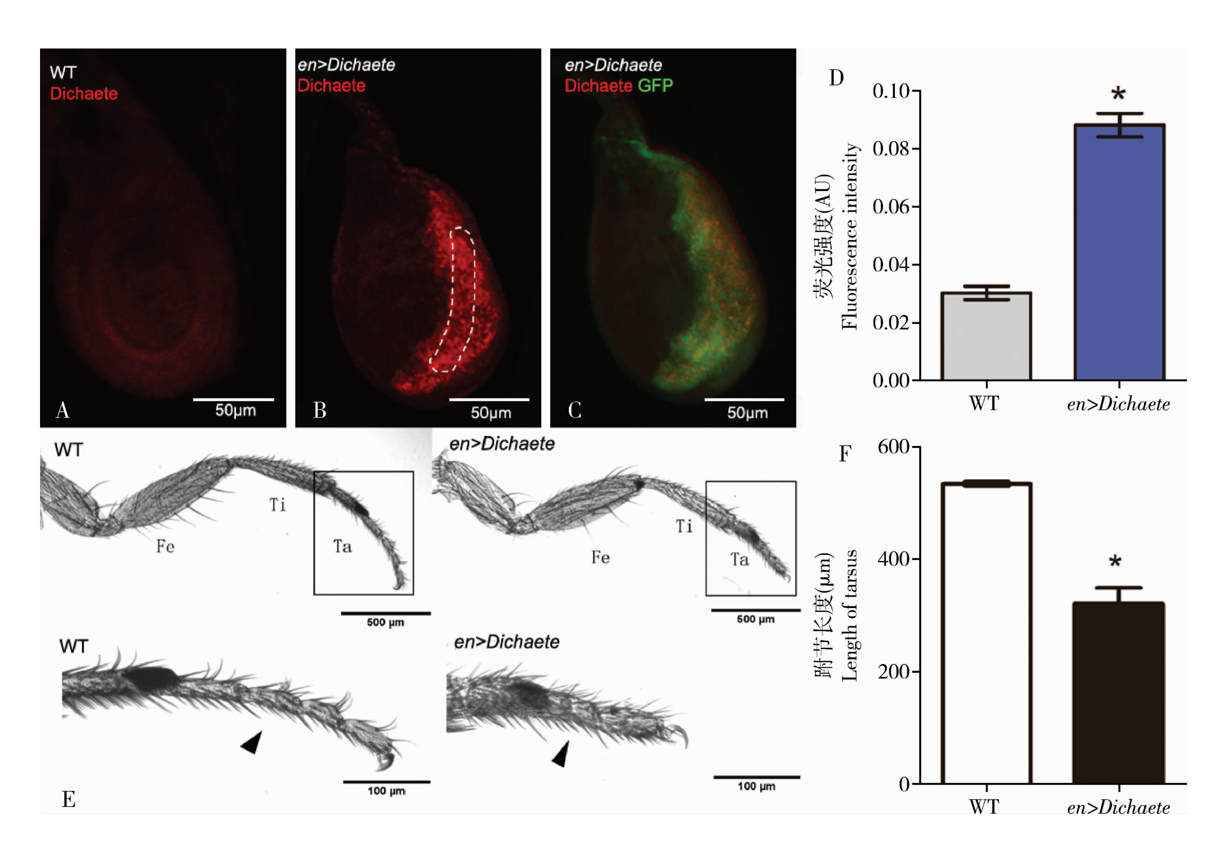


图 1　野生型（WT）和 *en* > *Dichaete* 基因型黑腹果蝇 3 龄幼虫足芽中 *Dichaete* 基因表达水平以及成虫足（前足）形态结构

Fig. 1　Expression levels of *Dichaete* in leg discs of the 3rd instar larvae and leg (foreleg) structure of adults in wild type (WT) and *en* > *Dichaete Drosophila melanogaster*

A：野生型 WT；B：*en* > *Dichaete*；C：*en* > *Dichaete* 基因型足芽中绿色荧光蛋白标记与 Dichaete 抗体染色叠加图 Overlay of GFP and anti-Dichaete in *en* > *Dichaete* leg discs；D：Dichaete 抗体染色荧光强度分析 Fluorescence intensity of anti-Dichaete；E：*Dichaete* 异位表达黑腹果蝇的成虫足表型 Leg phenotypes in *D. melanogaster* of ectopic expression with *Dichaete*；F：跗节长度分析 Analysis of tarsus length. Fe：足节 Femur；Ti：胫节 Tibia；Ta：跗节 Tarsus. WT：野生型果蝇 Wild type；*en* > *Dichaete*：*en* > *Dichaete* 基因型果蝇 *en* > *Dichaete* genotype；Dichaete：Dichaete 抗体染色 Dichaete antibody staining；GFP：绿色荧光蛋白标记 *en-Gal4* 表达区域 Green fluorescent protein indicating *en-Gal4* control region. B 图虚线标记荧光强度测量区域；D 和 F 图柱上星号标记极显著性差异（$P < 0.01$，*T* 检验）。Dashed part in Fig. B indicates the selected region where the fluorescence intensity of antibody staining was quantified and analyzed. The asterisk above bars in Figs. D and F indicates extremely significant difference ($P < 0.01$, *T* test).

间区 *Dichaete* 信号显著高于对照组，表明 *en* > *Dichaete* 果蝇幼虫足芽后隔间区 *Dichaete* 的表达水平显著提高(图 1：D)。

野生型果蝇成虫足的结构主要由基节、转节、足节、胫节、跗节和两个爪组成，其中最末端的跗节进一步细分为 5 小节(图 1：E)。在 *en-Gal*4，*dpp-Gal*4 驱动的 *Dichaete* 过表达的果蝇成虫中，足末端结构出现畸形，前、中、后足均出现相似的表型，表现为最远端的跗节分化失败，5 小节融合在一起并出现皱缩，跗节的长度缩短，导致整个足的长度缩短，而爪的结构并未受到影响(图 1：E ~ F，以 *en* > *Dichaete* 前足为例)，结果表明，异位表达的 *Dichaete* 导致成虫足末端跗节进一步分化失败，呈现结构缺陷。

2.2 *Dichaete* 异位表达引起黑腹果蝇幼虫足芽细胞凋亡增加

细胞凋亡状况是衡量细胞发育的重要指标，严重的细胞凋亡可能会造成组织器官形态发育缺陷(Bejarano *et al*., 2010)。因此，我们检测 *Dichaete* 异位表达是否引起细胞凋亡。在果蝇和其他动物中，细胞凋亡是通过激活 Caspases 蛋白执行的(Song *et al*., 1997)。本研究采用免疫组化方法，用 Caspase-3 抗体染色标记 Caspase-3 蛋白的变化，从而检测细胞凋亡的变化。结果显示，在对照组果蝇幼虫足芽中，未检测到明显的细胞凋亡(图 2：A)。与对照组相比，处理组果蝇幼虫足芽的后隔间区细胞凋亡增加，前隔间区未受到影响(图 2：B ~ C)。结果表明，异位表达 *Dichaete* 引起果蝇幼虫足芽细胞凋亡增加。为了探索成虫的足末端缺陷是否单纯由于细胞凋亡增加所引起，我们组建了 *en* > *p*35 品系，与 *UAS-Dichaete* 杂交，共表达 *p*35 和 *Dichaete*，抑制细胞凋亡，观察阻断细胞凋亡是否可以拯救成虫的足末端缺陷，结果发现，在 *Dichaete* 和 *p*35 共表达的足芽上，未检测到细胞凋亡的增加，表明细胞凋亡能被表达 p35 蛋白成功抑制(图 2：D ~ E)。单独表达 *p*35 成虫足发育正常，共表达 *Dichaete* 和 *p*35 成虫足仍然存在缺陷，结果表明，抑制细胞凋亡并不能完全恢复果蝇足形态的正常发育，我们推测有其他调控机制响应异位表达的 *Dichaete*。

2.3 异位表达 *Dichaete* 对黑腹果蝇幼虫足芽 Wg 和 Dpp 信号的活力无影响

在足芽的发育过程中，Wg 和 Dpp 信号指导足芽早期形貌发生(Lecuit and Cohen, 1997)。我们采用免疫组化的方法，检测 *Dichaete* 异位表达对足芽 Wg 和 Dpp 信号的影响。结果发现，在野生型果蝇幼虫足芽中，Wg 呈条带状分布在背侧区，Dpp 呈条带状分布在足芽的前隔间。在 *en* > *Dichaete* 果蝇幼虫足芽中，Wg 和 Dpp 的活力及表达模式与对照相比没有变化(图 3：A ~ F)。由于 *en-Gal*4 控制的 *Dichaete* 异位表达区域与 Wg 和 Dpp 信号表达的区域并不重叠，我们检测了 *Dpp-Gal*4 驱动 *Dichaete* 异位表达对 Wg 和 Dpp 信号的影响，作为补充。结果发现，与 *en-Gal*4 驱动的结果相似，Wg 和 Dpp 的活力及表达模式无明显变化，说明异位表达 *Dichaete* 对足芽 Wg 和 Dpp 活力无影响。

2.4 *Dichaete* 异位表达对 *Distal-less* 表达的影响

在果蝇足芽发育过程中，*Distal-less*(*Dll*)基因主要负责调控足的远端形态发育(Galindo *et al*., 2002；Estella *et al*., 2008)。为了进一步研究异位表达 *Dichaete* 对足芽发育的影响，探索成虫足末端结构缺陷的成因，本研究检测了异位表达 *Dichaete* 对 *Dll* 表达水平的影响。我们用 Dll-lacZ 标记 *en* > *dichaete* 果蝇 3 龄幼虫的足芽 *Dll* 基因，检测其表达水平，实验结果发现，对照组野生型果蝇幼虫足芽中，*Dll* 的表达成环状均匀清晰地分布在足芽前后隔间区(图 3：G)，在处理组(*en* > *Dichaete*)中，足芽后隔间区 *Dll* 表达显著升高(图 3：H ~ J)。说明异位表达的 *Dichaete* 引起了 *Dll* 表达的上调。因此，我们推测，异位表达的 *Dichaete* 引起 *Dll* 基因异常表达，导致成虫远端形态结构紊乱。利用 Genomatix Software Suite v3.9 对 *Dll* 的基因序列进行了转录因子结合位点分析预测，发现 *Dichaete* 与 *Dll* 基因序列 5′非编码区没有结合位点，推测它们之间并非直接调控，而是通过调控其他基因间接引起的。

3 讨论

Sox 蛋白是一类保守的转录因子家族，参与生物体的多种发育过程，其中对果蝇 B 家族 *Dichaete* 的研究较为深入(Aleksic *et al*., 2013)。目前已发现其主要参与胚胎分节、中枢神经发育、大脑发育以及后肠形成等(Sanchez-Soriano and Russell, 2000)。*Dichaete* 基因表达贯穿整个胚胎形成过程，在发育过程中的神经系统、肠道以及成虫盘上也有表达，因此，*Dichaete* 在不同组织的发育中可能具有特异的调控功能。前人报道，*Dichaete* 在翅芽上没有表达，Russell 研究发现，在翅上异位表达 *Dichaete* 会引起前翅基部的小翼消失(Russell, 2000)。在足芽上 *Dichaete* 仅有微弱的表达，我们前期干扰足芽 *Dichaete*

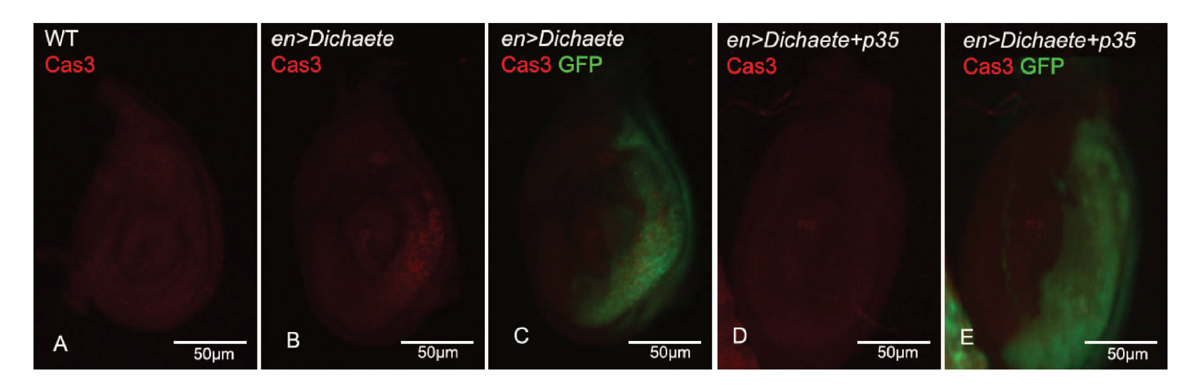


图 2　*Dichaete* 异位表达对黑腹果蝇 3 龄幼虫足芽细胞凋亡的影响

Fig. 2　Effect of ectopic expression of *Dichaete* on apoptosis in leg discs of the 3rd instar larvae of *Drosophila melanogaster*

A：野生型足芽细胞凋亡检测 Apoptosis in wild type leg discs；B：*en* > *Dichaete* 基因型足芽细胞凋亡检测 Apoptosis in *en* > *Dichaete* leg discs；C：*en* > *Dichaete* 基因型足芽中绿色荧光蛋白标记与 Caspase-3 抗体染色叠加图 Overlay of GFP and anti-Caspase-3 in *en* > *Dichaete* leg discs；D：*en-Gal4* 驱动 *Dichaete* 和 *p35* 共表达的足芽细胞凋亡检测 Apoptosis in *en* > *Dichaete* + *p35* leg discs；E：*en-Gal4* 驱动 *Dichaete* 和 *p35* 共表达的绿色荧光蛋白标记与 Caspase-3 抗体染色叠加图 Overlay of GFP and anti-Caspase-3 in *en* > *Dichaete* + *p35* leg discs. WT：野生型果蝇 Wild type；*en* > *Dichaete*：*en* > *Dichaete* 基因型果蝇 *en* > *Dichaete* genotype；Cas3：Caspase-3 抗体染色 Caspase-3 antibody staining；GFP：绿色荧光蛋白标记 *en-Gal4* 表达区域 Green fluorescent protein indicating *en-Gal4* control region.

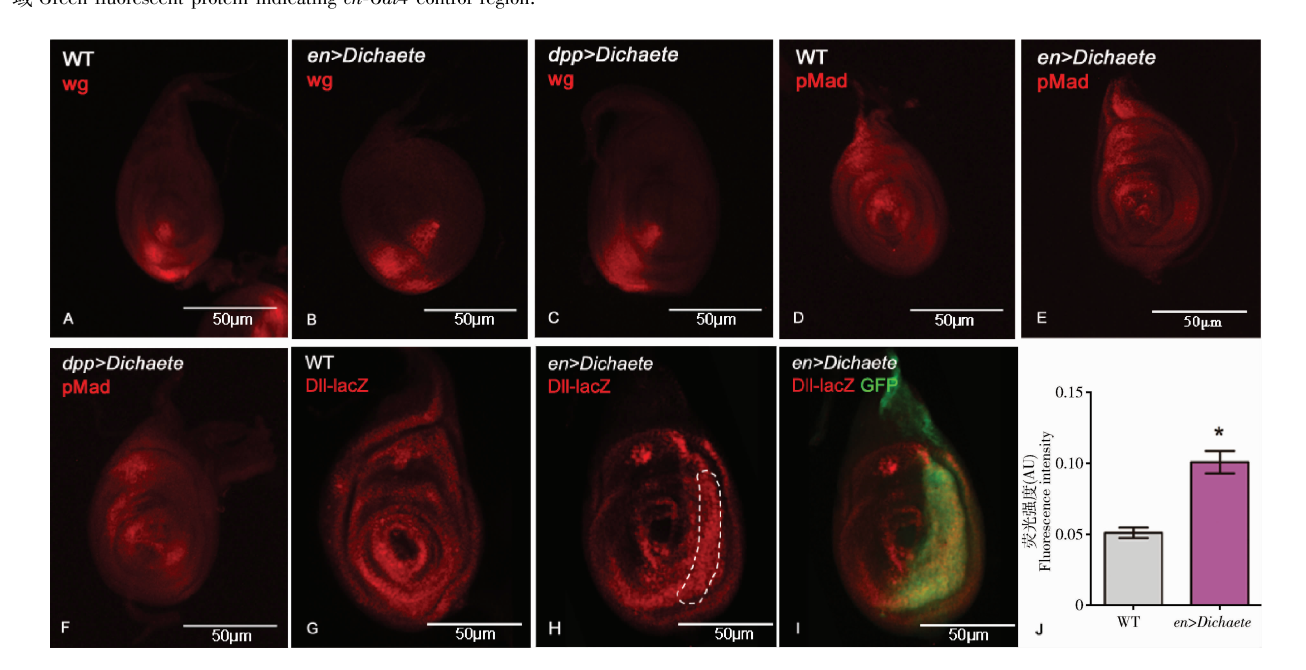


图 3　*Dichaete* 异位表达对黑腹果蝇 3 龄幼虫足芽 Wg 和 Dpp 信号活力的影响以及对 *Dll* 表达的影响

Fig. 3　Effect of ectopic expression of *Dichaete* on Wg and Dpp signaling activities and *Dll* expression in leg discs of the 3rd instar larvae of *Drosophila melanogaster*

A – C：分别是野生型(A)、*en* > *Dichaete* 基因型(B)和 *dpp* > *Dichaete* 基因型(C)足芽 Wg 信号检测 Wg expression in wild type (A), *en* > *Dichaete* (B) and *dpp* > *Dichaete* (C) leg discs, respectively；D – F：分别是野生型(D)、*en* > *Dichaete* 基因型(E)和 *dpp* > *Dichaete* 基因型(F)足芽 Dpp 信号检测 Dpp expression in wild type (D), *en* > *Dichaete* (E) and *dpp* > *Dichaete* (F) leg discs, respectively. pMad：pMad 抗体染色标记 Dpp 信号活力 pMad antibody staining reflecting Dpp signaling activity；Wg：Wingless 抗体染色 Wingless antibody staining；G：野生型足芽 *Dll* 表达检测 *Dll* expression in wild type leg discs；H：*en* > *Dichaete* 基因型足芽 *Dll* 表达检测 *Dll* expression in *en* > *Dichaete* leg discs；I：*en* > *Dichaete* 基因型足芽中绿色荧光蛋白与 Dll-lacZ 标记叠加图 Overlay of GFP and Dll-lacZ in *en* > *Dichaete* leg discs；J：Dll-lacZ 荧光强度分析 Fluorescence intensity of Dll-lacZ. Dll-lacZ：Dll-lacZ 标记 *Dll* 基因的表达水平 Expression level of Dll-lacZ labeled *Dll*；GFP：绿色荧光蛋白标记 *en-Gal4* 表达区域 Green fluorescent protein indicates *en-Gal4* control region. I 图虚线标记荧光强度测量区域；J 图柱上星号标记极显著性差异($P < 0.01$, T 检验)。Dashed part in Fig. I indicates the selected region where the fluorescence intensity of antibody staining was quantified and analyzed. Asterisk above bars in Fig. J indicates extremely significant difference ($P < 0.01$, T test).

的表达，未发现足部发育异常。运用 *en-Gal4* 驱动 *Dichaete* 在足芽异位表达，发现成虫足跗节分化失败，足部末端皱缩。结果表明，*Dichaete* 的异位表达影响足末端结构发育，解剖蛹前期的足芽，发现其形

貌结构并未发生变化,我们推测,足发育的缺陷是在蛹中后期的发育过程中产生的。

细胞凋亡是极为重要的细胞生理过程。在完全变态昆虫中,细胞凋亡贯穿于整个发育过程中,对于维持个体正常生长发育及成虫器官的形成极为重要(刘影等, 2009)。一旦细胞凋亡规律出现紊乱,生物个体会表现出发育畸形、生长停滞甚至死亡的现象(Bejarano *et al.*, 2010)。Russell(2000)的研究发现,*Dichaete* 对翅芽的细胞凋亡具有诱导作用,异位表达的 *Dichaete* 引起突变体果蝇翅芽的近端细胞凋亡增加,从而导致成虫的翅铰链区畸形。为了进一步研究 *Dichaete* 在果蝇足发育过程中的作用机制,我们检测了异位表达 *Dichaete* 的果蝇幼虫足芽细胞凋亡,发现异位表达的 *Dichaete* 引起了幼虫足芽的细胞凋亡增加,由于抑制细胞凋亡并不能拯救成虫足部的缺陷,因此,我们推测,细胞凋亡的增加并不是引起足末端形态缺陷的主要原因。

尽管 Sox 家族的功能已经有一定的研究,但是它们调控的靶标基因鲜有报道,只有很少的靶标基因被鉴定,包括哺乳动物的 *nestin* (Tanaka *et al.*, 2004), *fgf*4 (Ambrosetti *et al.*, 1997), *HoxB*1 (Di Rocco *et al.*, 2001), *UTF*1 (Nishimoto *et al.*, 1999) 和 *crystalline* (Kamachi *et al.*, 1995),以及果蝇的 *crystalline* (Blanco *et al.*, 2005), *slit* 和 *vnd* (Yu *et al.*, 2005)。在果蝇中,Dichaete 调控的靶标基因以及与之互作的基因在不同组织部位有所不同。比如,在神经胶质中,Dichaete 调控 *slit* 基因 (Sanchez-Soriano and Russell, 1998),在胚胎分节过程中调控 *pair-rule* 基因(Russell *et al.*, 1996),在后肠发育过程中,调控 Dpp 基因(Sanchez-Soriano and Russell, 2000),在翅芽上,和 Wg 信号有关(Russell, 2000)。在足芽的发育过程中, Wg 和 Dpp 信号都与 D/V 轴线和 P/D 轴线形成密切相关(Galindo *et al.*, 2002)。与翅上有所不同,足芽上 Wg 和 Dpp 都沿着 A/P 边界在 Hedgehog 的控制下表达。Wg 调控腹侧细胞命运分化,Dpp 调控背侧细胞命运分化(Lecuit and Russell, 1997)。在足芽上,Wg 和 Dpp 基因是否为 *Dichaete* 调控的靶标基因? 我们检测了异位表达的 *Dichaete* 对 Wg 和 Dpp 信号的影响,结果发现,在 *Dichaete* 异位表达的足芽中,Wg 和 Dpp 信号没有明显变化,说明它们不是 *Dichaete* 作用的靶标基因。

Wg 和 Dpp 信号这两个重要的信号通路都激活 *Dac* 和 *Dll* 的表达来调控足芽的发育,其中,*Dac* 编码一个核蛋白,在足节和胫节表达,而 *Dll* 编码一个同源结构域蛋白,在足的远端表达。在发育 84 h 后,近远端形态的形成不再依赖 Wg 和 Dpp,而是由 *Dac* 和 *Dll* 基因自主调控(Estella *et al.*, 2008)。*Dll* 是足芽远端发育重要的调控基因,主要在足芽的中心区域表达。在 3 龄中后期幼虫的足芽中,*Dll* 表达对应足的远端大部分区域,包括胫节和末端的跗节(Galindo *et al.*, 2002)。Gorfinkiel 等(1997)研究发现,在足芽增加 *Dll* 的表达可影响足末端结构发育,导致末端结构尺寸减小,严重的甚至导致末端结构丧失(Gorfinkiel *et al.*, 1997)。*Dll* 的正常表达对于维持足末端结构非常重要。我们的研究发现,在 *Dichaete* 基因异位表达的果蝇幼虫足芽中,*Dll* 表达升高,表明 *Dichaete* 基因参与调控 *Dll* 的表达。有研究报道,*Dichaete* 与 *Dll* 同为成神经细胞发育过程中所必需的短期调控因子,在视神经叶的发育过程中存在着相互调控关系(Rossi *et al.*, 2017)。我们推测 *Dichaete* 基因通过调控 *Dll* 的表达影响足芽 P/D 形态发育,导致成虫足远端发育畸形。

综上所述,本实验运用 Gal4/UAS 系统异位表达果蝇 Sox 家族 *Dichaete* 基因,研究 *Dichaete* 对果蝇足部发育的影响,发现异位表达 *Dichaete* 导致成虫足末端结构缺陷,为了探索成虫足部缺陷的成因,我们检测了 Wg 和 Dpp 信号通路,发现它们没有发生明显变化,进一步检测了远端调控基因 *Dll* 的表达,结果表明,*Dll* 响应 *Dichaete* 的表达变化,基因表达上调。由此推测,成虫足末端结构缺陷可能是由于 *Dll* 表达紊乱造成的。下一步,我们将在异位表达 *Dichaete* 的同时,温和地下调 *Dll* 的表达,检测足部发育的变化,运用 Flp/Ay 系统在幼虫足芽随机制造 *Dichaete* 异位表达克隆,检测克隆区域的 *Dll* 表达以及相关信号通路的变化,进一步探究 *Dichaete* 调控 *Dll* 表达的作用机制,为深入研究果蝇足部发育的调控机制提供基础。

参考文献 (References)

Aleksic J, Ferrero E, Fischer B, Shen SP, Russell S, 2013. The role of *Dichaete* in transcriptional regulation during *Drosophila* embryonic development. *BMC Genet.*, 14(1): 861.

Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L, 1997. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell. Biol.*, 17(11): 6321 - 6329.

Baxevanis AD, Landsman D, 1995. The HMG-1 box protein family classification and functional-relationships. *Nucleic Acids Res.*, 23

(9): 1604–1613.

Bejarano F, Smibert P, Lai EC, 2010. miR-9a prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila* LIM-only. *Dev. Biol.*, 338(1): 63–67.

Blanco J, Girard F, Kamachi Y, Kondoh H, Gehring WJ, 2005. Functional analysis of the chicken delta1-crystallin enhancer activity in *Drosophila* reveals remarkable evolutionary conservation between chicken and fly. *Development*, 132(8): 1895–1905.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6): 947–956.

Chao AT, Jones WM, Bejsovec A, 2007. The HMG-box transcription factor SoxNeuro acts with Tcf to control Wg/Wnt signaling activity. *Development*, 134(5): 989–997.

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norriss D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, 1996. A comparison of the properties of *Sox*-3 with *Sry* and two related genes, *Sox*-1 and *Sox*-2. *Development*, 122(2): 509–520.

Condic ML, Fristrom D, Fristrom JW, 1991. Apical cell shape changes during *Drosophila* imaginal leg disc elongation: a novel morphogenetic mechanism. *Development*, 111(1): 23–33.

Di Rocco G, Gavalas A, Popperl H, Krumlauf R, Mavilio F, Zappavigna V, 2001. The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the *Hoxb*1 auto-regulatory enhancer function. *J. Biol. Chem.*, 276(23): 20506–20515.

Dichtel-Danjoy ML, Caldeira J, Casares F, 2009. *SoxF* is part of a novel negative-feedback loop in the *wingless* pathway that controls proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Development*, 136(5): 761–769.

Estella C, McKay DJ, Mann RS, 2008. Molecular integration of Wingless, Decapentaplegic, and autoregulatory inputs into *Distalless* during *Drosophila* leg development. *Dev. Cell*, 14(1): 86–96.

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell Badge R, Bianchi ME, 1992. Sry, like HMG-1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.*, 11(12): 4497–4506.

Fristrom D, 1988. The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review. *Tissue Cell*, 20(5): 645–690.

Galindo MI, Bishop SA, Greig S, Couso JP, 2002. Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science*, 297(5579): 256–259.

Gorfinkiel N, Morata G, Guerrero I, 1997. The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 11(17): 2259–2271.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281): 245–250.

Kamachi Y, Sockanathan S, Liu Q, Breitman M, Lovell-Badge R, Kondoh H, 1995. Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J.*, 14(14): 3510–3519.

Lecuit T, Cohen SM, 1997. Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature*, 388(6638): 139–145.

Liu Y, Liu HH, Li S, 2009. Apoptosis and autophagy during *Drosophila* metamorphosis. *Chin. Bull. Entomol.*, 46(5): 673–677. [刘影, 刘韩菡, 李胜, 2009. 果蝇变态过程中的细胞凋亡和细胞自噬. 昆虫知识, 46(5): 673–677]

Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M, 1999. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.*, 19(8): 5453–5465.

Overton PM, Chia W, Buescher M, 2007. The *Drosophila* HMG-domain proteins SoxNeuro and Dichaete direct trichome formation via the activation of *shavenbaby* and the restriction of Wingless pathway activity. *Development*, 134: 2807–2813.

Payre F, Vincent A, Carreno S, 1999. *Ovo/svb* integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature*, 400(6741): 271–275.

Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R, 1998. A role for SOX1 in neural determination. *Development*, 125(10): 1967–1978.

Rossi AM, Fernandes VM, Desplan C, 2017. Timing temporal transitions during brain development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 42: 84–92.

Russell S, 2000. The *Drosophila* dominant wing mutation *Dichaete* results from ectopic expression of a *Sox*-domain gene. *Mol. Gen. Genet.*, 263(4): 690–701.

Russell SR, Sanchez-Soriano N, Wright CR, Ashburner M, 1996. The *Dichaete* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a SOX-domain protein required for embryonic segmentation. *Development*, 122(11): 3669–3676.

Sanchez-Soriano N, Russell S, 1998. The *Drosophila* Sox domain protein Dichaete is required for the development of the central nervous system midline. *Development*, 125(20): 3989–3996.

Sanchez-Soriano N, Russell S, 2000. Regulatory mutations of the *Drosophila* Sox gene *Dichaete* reveal new functions in embryonic brain and hindgut development. *Dev. Biol.*, 220(2): 307–321.

Song Z, Mccall K, Steller H, 1997. DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science*, 275(5299): 536–540.

Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H, 2004. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the *Nestin* gene in neural primordial cells. *Mol. Cell Biol.*, 24(20): 8834–8846.

Trinkaus JP, 1984. Cells into Organs: the Forces That Shape the Embryo. Prentice Hall Inc., Englewood Cliff, NJ. 543 pp.

Wegner M, 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.*, 27(6): 1409–1420.

Yu Z, Syu LJ, Mellerick DM, 2005. Contextual interactions determine whether the *Drosophila* homeodomain protein, Vnd, acts as a repressor or activator. *Nucleic Acids Res.*, 33(1): 1–12.

(责任编辑：马丽萍)